COATEST® APC™ Resistance - 82 2643 63

FRANÇAIS - Révision de la notice 06/2002

CE

Utilization prevue

Mesure de la réponse anticoagulante à la protéine C activée (APC) dans le plasma humain, chez les individus atteints de maladie thrombo-embolique soupçonnée ou avérée.

Contexte et resume

La résistance à l'APC est un trouble de la voie anticoagulante de la protéine C qui constitue un important facteur de risque de maladie thrombo-embolique. Le phénotype de résistance à l'APC se caractérise par une réponse anticoagulante anormalement faible dans le plasma humain lors de l'addition de l'APC humaine.[1-5]
La responsabilité en revient dans plus de 90% des cas à une mutation du gène du facteur V. Cette mutation rend l'un des sites de clivage de l'APC au niveau du facteur Va moins apte au clivage par suite d'une substitution d'acides aminés (Arg^{506} -> Gln).[6, 7]
Pour les cas restants, d'autres pathologies héréditaires ou acquises contribuent au phénotype de résistance à l'APC.[8-10] Coatest APC Resistance fournit une méthode de détermination de la réponse à l'APC humaine basée sur le temps de céphaline-kaolin (APTT).[11, 12] L'allongement du temps de céphaline-kaolin activé basal après addition de l'APC est moindre dans le plasma de sujets porteurs du phénotype de résistance à l'APC que chez ceux qui présentent une réponse normale à l'APC.

Principe de mesure

Le plasma est incubé pendant une durée standard avec le réactif mis en œuvre pour la mesure du temps de céphaline-kaolin. Après avoir déclenché la coagulation par l'addition de $CaCl_2$ en l'absence et en présence de l'APC humaine, on enregistre le temps qui s'écoule jusqu'à la prise en masse du caillot.

REACTIFS

1. **$CaCl_2$** 1 flacons
   8 mL de chlorure de calcium à 0,025 mol/L dans du tampon Tris contenant 0,5 % de sérum-albumine bovine.
2. **Réactif APTT pour temps de céphaline-kaolin** 1 flacons
   16 mL de phospholipides purifiés avec de la silice colloïdale comme activateur de contact. Contient un conservateur. Mélanger soigneusement à l'aide d'un vortex avant l'emploi.
3. **APC/$CaCl_2$** 4 flacons
   Protéine C activée d'origine humaine, colyophilisée avec du $CaCl_2$. Reconstituer à l'aide de 2,0 mL eau NCCLS type II.[13] Laisser reposer pendant 30 minutes à une température de 20-25°C et mélanger prudemment avant l'emploi.

Les réactifs 2 et 3 ne sont pas interchangeables entre lots.

ATTENTION: Chaque unité de donneur servant à la préparation de réactifs de source humaine a été soumise à une recherche de la présence d'antigène de surface de l'hépatite B et d'anticorps dirigés contre le VIH 1 et 2 et le virus de l'hépatite C au moyen de tests homologués par la FDA, qui ont donné des résultats négatifs. Toutefois, eu égard au fait qu'aucun test ne permet d'exclure à 100% la présence de ces maladies à diffusion par voie sanguine, il convient de manipuler et d'évacuer avec précaution les réactifs de source humaine à base de ce produit.

Eviter le contact avec la peau et les yeux (S24/25).
Ne pas jeter les résidus à l'égout (S29).
Porter un vêtement de protection approprié (S36).

Ce produit est à usage diagnostique *in vitro.*

Materiel necessaire mais non fournli:

— Eau désionisée, filtrée sur filtre de 0,22 µm, ou eau NCCLS type II.[13]
— Pipette étalonnée.
— Utiliser des appareils de mesure de la coagulation automatiques ou semi-automatiques basés sur des méthodes de détection mécaniques ou optiques.

REMARQUE: Lors de l'utilisation d'appareils de mesure automatiques ou semi-automatiques, se rapporter toujours au manuel de l'opérateur, fourni par le fabricant de l'appareil, pour des procédures exactes.

Conditions de conservation et stabilité

Les réactifs scellés sont stables à des températures de 2 à 8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. Eviter la contamination des réactifs par des microorganismes.

1. **$CaCl_2$**
   Stable une fois le flacon entamé pendant 1 semaine à 15-25°C ou pendant 1 mois à 2-8°C dans le flacon d'origine.
2. **Réactif APTT pour temps de céphaline-kaolin**
   Stable une fois le flacon entamé pendant 1 semaine à 15-25°C ou 1 mois à 2-8°C dans le flacon d'origine. Ne pas congeler.
3. **APC/$CaCl_2$**
   Stable après la reconstitution pendant 2 heures à 37°C, pendant 8 heures à 15-25°C, pendant 5 jours à 2-8°C ou pendant 3 mois à -20°C ou á des températures inférieures dans le flacon d'origine. *Voir REMARQUE.

*REMARQUE: Décongeler à 37°C le réactif et mélanger prudemment avant l'emploi. Ne pas recongeler.

Contrôle de qualité

Des Contrôle plasmatique 1 et 2 doivent être utilisés aux fins de validation de la série de tests. L'on peut aussi se procurer séparément chez Chromogenix du Contrôle plasmatique 1 (art. n° 82 2650 63) et du Contrôle plasmatique 2 (art. n° 82 2668 63). Contrôle plasmatique 1 présente une réponse normale à l'APC et le Contrôle plasmatique 2 une réponse anormale. Des fourchettes de rapports de l'APC attendus sont communiquées avec chaque lot. L'obtention de valeurs hors des limites de la fourchette précisée devra conduire à répéter l'analyse, après avoir procédé à une vérification complète des réactifs et du fonctionnement des instruments. (Voir la section Etalonnage pour un emploi conforme au CQ des plasmas Contrôle plasmatique 1 et 2).

Recueil des échantillons

Effectuer le prélèvement après que le patient se soit reposé pendant 10 minutes. Recueillir le sang (9 volumes) sur du citrate de sodium à 0,1 mol/L (1 volume) et centrifuger à 2000 g, 20 minutes à la température ambiante, dans un délai maximal de 7 heures. Séparer soigneusement le plasma des éléments figurés dans les 30 minutes qui suivent. Afin d'éviter toute contamination par les plaquettes, on utilisera uniquement la portion intermédiaire du plasma. L'analyse du plasma doit intervenir dans les 8 heures suivant le prélèvement. Une alternative consiste à le congeler rapidement à -70°C en aliquotes de 1 mL ou moins, puis à le conserver pendant un maximum de 3 ans à -70°C. Les échantillons ne doivent pas être conservés dans un congélateur à dégivrage automatique, ni être décongelés et recongelés avant le test. Traiter les échantillons comme potentiellement infectieux. Pour tout complément d'informations, se reporter au document H21-A3 NCCLS.[14]

Procedure

1. Amener tous les réactifs à la température ambiante avant l'emploi. Décongeler rapidement à 37°C les prélèvements de plasma congelé de façon standardisée en veillant à exposer le prélèvement à une perte négligeable de l'activité des facteurs de coagulation labiles et en vérifiant l'absence de cryoprécipités.
2. Préchauffer un volume suffisant de $CaCl_2$ et d'APC/$CaCl_2$ à 37±0,5°C.
3. Ajouter un volume de plasma dans l'éprouvette ou dans la cuvette, puis compléter par un volume identique du réactif pour le temps de céphaline-kaolin. Faire incuber à 37°C pendant 5 minutes. Un appareil de mesure, comportant une durée d'incubation differente, préréglée, peut être utilisé à condition que la durée soit au minimum de 3 minutes.
4. Ajouter un volume de $CaCl_2$ et commencer simultanément à chronométrer la formation du caillot. Enregistrer le délai nécessaire à la formation du caillot.
5. Procéder à une seconde analyse du prélèvement plasmatique en remplaçant $CaCl_2$ par APC/$CaCl_2$ et enregistrer le délai de la formation du caillot.

REMARQUE: En cas d'utilisation d'instruments automatisés, il est préférable de prolonger jusqu'à un minimum de 150 secondes la durée de détection de la prise en masse du caillot.

Résultats

Calculer le rapport de l'APC pour les prélèvements et les contrôles:

$$\text{Rapport de l'APC} = \frac{\text{Temps de coagulation APC/CaCl}_2}{\text{Temps de coagulation CaCl}_2}$$

Un rapport de l'APC inférieur ou égal à la valeur seuil (voir Etalonnage) indique une réponse faible correspondant au phénotype de résistance de l'APC. En cas d'obtention d'une telle réponse faible, il est recommandé de procéder à l'analyse d'un second échantillon recueilli séparément pour confirmation.

REMARQUE: Les échantillons de plasma frais ou congelés doivent être évalués par référence à une normale issue de l'analyse d'échantillons de plasma frais ou congelés – selon le cas – de sujets sains. Les échantillons frais donnent généralement des rapports de l'APC un peu plus élevés.

Evaluation du coffret

REPETABILITE ET PRECISION

L'imprécision des temps de coagulation obtenus en présence et en l'absence de l'APC été déterminée par analyse de trois échantillons de plasma présentant une réponse différente de l'APC. Les analyses ont été effectuées à 7 reprises, y compris 5 reproductions de chaque plasma conformément à la référence EP5-T2 NCCLS.[15]

	$CaCl_2$ (s)	Intrasérie	Intersérie
Réponse forte	29,9	CV = 1,8%	CV = 4,2%
Contrôle plasmatique 1	32,0	CV = 2,0%	CV = 3,9%
Contrôle plasmatique 2	32,2	CV = 1,1%	CV = 0,8%
	APC/$CaCl_2$ (s)	Intrasérie	Intersérie
Réponse forte	122	CV = 2,4%	CV = 2,0%
Contrôle plasmatique 1	116	CV = 4,3%	CV = 5,0%
Contrôle plasmatique 2	64,5	CV = 1,4%	CV = 1,6%
	Rapport de l'APC	Intersérie	
Réponse forte	4,1	CV = 5,0%	
Contrôle plasmatique 1	3,6	CV = 3,3%	
Contrôle plasmatique 2	2,0	CV = 1,4%	

D'une manière générale, l'imprécision du rapport de l'APC est d'autant moins grande que les valeurs de ce rapport sont faibles. L'étude ci-dessus a été réalisée sur un instrument ACL 300. L'analyse en double ou en triple de 17 à 20 échantillons de plasma sur 9 types d'instruments différents, a abouti à un CV intrasérie égal respectivement à 2,0% (extrêmes: 0,3-4,2%) et 3,9% (extrêmes: 0,8-11,3%) en l'absence et en présence de l'APC.

Etalonnage

Le rapport effectif de l'APC qui correspond à une réponse limite à l'APC, est susceptible de légères variations dues à l'instrumentation utilisée, de même qu'à l'état de l'instrument. Il est recommandé que chaque utilisateur vérifie les performances de son instrument et parvienne à une estimation de la valeur seuil de résistance à l'APC en appliquant la procédure suivante:

1. Effectuer cinq déterminations indépendantes du rapport de l'APC – au moins en triple dans chaque série – d'un échantillon de plasma présentant une réponse normale à l'APC. Confirmer que la variation inter- et intratest du rapport de l'APC est inférieure à 7%.
2. Déterminer les rapports de l'APC pour 50 à 100 échantillons de plasma provenant de sujets sains âgés de 20 à 65 ans, répartis en un nombre sensiblement égal d'hommes et de femmes non enceintes. Les individus sains sélectionnés seront autant que possible représentatifs de la communauté régionale. Inclure le plasma témoin niveau 1 et le plasma témoin niveau 2. La distribution du rapport de l'APC doit être reconnue non gaussienne.
3. S'assurer que les rapports de l'APC pour les plasmas témoins sont bien à l'intérieur de la fourchette précisée.
4. Calculer le rapport médian de l'APC. Si cette valeur est égale ou inférieure à 2,6, il est conseillé, de manière à obtenir une résolution plus élevée, de reconstituer l'ampoule de APC/$CaCl_2$ avec 1,5 mL d'eau au lieu de 2,0 mL.
5. Calculer la valeur-seuil de résistance à l'APC en multipliant le rapport de l'APC médian par 0,75 s'il est inférieur à 3 et en multipliant le rapport de l'APC médian par 0,80 s'il est égal ou supérieur à 3.
6. Le rapport de l'APC pour le Contrôle plasmatique 1 doit se situer dans les limites de la normale. Le rapport de l'APC pour le Contrôle plasmatique 2 doit se situer en dessous de la valeur seuil.

Interpretation des résultats

Si l'analyse de deux échantillons de sang recueillis indépendamment révèle qu'un individu est porteur du phénotype de résistance à l'APC, il est recommandé de pratiquer une analyse de contrôle en recherchant l'existence éventuelle d'une mutation du facteur V.

Limitations/facteurs interferents

Le temps de céphaline-kaolin (APTT) doit se trouver dans les limites de la normale. Des échantillons de plasma présentant des temps de céphaline-kaolin allongés, par suite notamment de déficits en facteurs intrinsèques de la coagulation ou de l'existence d'anticorps dirigés contre les protéines des phospholipides, ne permettraient de tirer de l'effet de l'addition de l'APC aucune conclusion fiable. Les sujets à étudier ne doivent pas être sous héparinothérapie ou sous OAC. Dans ce dernier cas, le traitement sera arrêté pendant au minimum une semaine, jusqu'au rétablissement du temps de Quick de base. Comme pour tous les tests basés sur l'APC, on prendra soin d'éviter une activation de contact des échantillons, en raison du risque inhérent d'activation des facteurs VIII et V. Pour des motifs analogues, il importe de même d'éviter toute contamination plaquettaire des échantillons de plasma (voir à Recueil des échantillons).

Valeurs de reference

Les rapports de l'APC issus de l'analyse du plasma de 100 sujets sains (51 hommes et 49 femmes, âge: 20 à 58 ans) sur cinq instruments de coagulation différents, se situaient dans une fourchette comprise entre 2 et 5.

Bibliography / Literatur / Bibliografía / Bibliographie / Bibliografia /Bibliografia / Litteratur / Litteraturförteckning / Βιβλιογραφία

1. Dahlbäck B et al. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: Prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci* 90, 1004-1008 (1993).
2. Griffin J H et al. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood* 82, 1989-1993 (1993).
3. Koster T et al. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 342,1503-1506 (1993).
4. Fisher M et al. Activated protein C resistance in ischemic stroke not due to factor V Arginine^{506}-> Glutamine mutation. *Stroke* 27, 1163-1166 (1996).
5. Rosén S and Sturk A. Activated protein C resistance - A major risk factor for thrombosis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 35, 501-516 (1997).
6. Bertina R et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369, 64-67 (1994).
7. Zöller B et al. Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis prone families with inherited resistance to activated protein C. *J Clin Invest* 94, 2521-2524 (1994).
8. Bernardi F et al. A factor V genetic component differing from factor V R506Q contributes to the activated protein C resistance phenotype. *Blood* 90,1552-1557 (1997).
9. Williamson D et al. Factor V Cambridge: A new mutation (Arg^{306} ->Thr) associated with resistance to activated protein C. *Blood* 91, 1140-1144 (1998).
10. Cumming A M et al. Development of resistance to activated protein C during pregnancy. *Br J Haematol* 90, 725-727 (1995).
11. Rosén S et al. Multicenter evaluation of a kit for activated protein C resistance on various coagulation instruments using plasmas from healthy individuals. *Thromb Haemost* 72, 255-260 (1994).
12. Freyburger G et al. Response to activated protein C upon storage of whole blood and plasma. *Thromb Res* 93 (2), (1999).
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Specifications for reagent water used in the clinical laboratory, NCCLS Approved Standard: ASC-3.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays, NCCLS Document H21-A3; vol. 11 No. 23.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP5-T2. User evaluation of clinical chemistry devises.

US Patent 5,443,960; EP 0 608 235; Australia 666 484; Japan 2562000; Canada 2,119,761.

Symbols used / Verwendete Symbole / Símbolos utilizados / Symboles utilisés / Simboli impiegati / Símbolos utilizados / Anvendte symboler / Använda Symboler / Χρησιμοποιηθέντα σύμβολα

IVD	LOT				CONTROL				
In vitro diagnostic medical device	Batch code	Use by	Temperature limitation	Consult instructions for use	Control	Biological risks	Manufacturer	Authorised representative	EC REP
In-vitro Diagnostikum	Chargen-Bezeichnung	Verwendbar bis	Festgelegte Temperatur	Beilage beachten	Kontrollen	Biologisches Risiko	Hergestellt von	Bevollmächtigter	
De uso diagnóstico *in vitro*	Identificación número de lote	Caducidad	Temperatura de Almacenamiento	Consultar la metódica	Control	Riesgo biológico	Fabricado por	Representante autorizado	
Dispositif mèdical de diagnostic *in vitro*	Désignation du lot	Utilisable jusqu'à	Températures limites de conservation	Lire le mode d'emploi	Contrôle	Risque biologique	Fabricant	Mandataire	
Per uso diagnostico *in vitro*	Numero del lotto	Da utilizzare prima del	Limiti di temperatura	Vedere istruzioni per l'uso	Controllo	Rischio biologico	Prodotto da	Rappresentanza autorizzata	
Dispositivo médico para utilização em diagnóstico *in vitro*	Número de lote	Data límite de utilização	Límite de temperatura	Consultar as instruções de utilização	Controlo	Risco biológico	Fabricado por	Representante autorizado	
"in vitro" diagnostisk udstyr	Batch nr.	Anvendelse	Temperatur begrænsninger	Se vejledning for anvendelse	Kontrol	Miljø oplysninger	Producent	Leverandør	
In vitro diagnostisk medicinsk produkt	Tillverkningskod	Användning	Temperatur gräns	Ta del av instruktionen före användning	Kontroll	Biologiska risker	Tillverkare	Auktoriserad representant	
Προϊόν για διαγνωστική χρήση *In vitro*	Αρ. Παρτίδας	Χρήση έως	Περιορισμοί θερμοκρασίας	Συμβουλευτήτε τις οδηγίες χρήσης	Υλικό ποιοτικού ελέγχου	Βιολογικοί κίνδυνοι	Κατασκευαστής	Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος	

Instrumentation Laboratory Company - Lexington, MA 02421-3125 (USA)
Instrumentation Laboratory SpA - V.le Monza 338 - 20128 Milano (Italy) EC REP

302163 R1 06/2002